

<b>NEURON</b>	<b>Evaluación de la toxicidad de 24 composiciones anestésicas en la línea celular CaCO-2 (de tejido epitelial humano)</b>	
ID CLIENTE: CL139	ID OFERTA: 2010/020	Fecha: 05/11/10

**INDICE:**

- 1. OBJETIVO**
- 2. MATERIALES Y MÉTODOS**
- 3. RESULTADOS**
- 4. DISCUSIÓN**

	<b>Evaluación de la toxicidad de 24 composiciones anestésicas en la línea celular CaCO-2 (de tejido epitelial humano)</b>	
ID CLIENTE: CL139	ID OFERTA: 2010/020	Fecha: 05/11/10

## 1. OBJETIVO

El objetivo de este estudio es demostrar que existe un efecto sinérgico en la disminución de los efectos adversos en la composición de tres anestésicos tópicos (Lidocaína (L), Prilocaina (P), Tetracaína (T)), respecto a la misma concentración total de anestésico de cada uno de los anestésicos por separado.

Tenemos en cuenta dos puntos:

- Para que la comparación sea válida, las composiciones tienen que conservar la misma cantidad de anestésico total en cada composición que se va a comparar.
- Probar diferentes rangos de concentración de acuerdo con las reivindicaciones de la solicitud de la patente.

Las 24 composiciones anestésicas a testar son las siguientes:

1) Rango inferior de concentración reivindicado:  $0.5L + 0.5P + 0.5T$  (1.1), comparado con:

1.2) 1.5L            1.3) 1.5P            1.4) 1.5T

2) Rango superior de concentración reivindicado:  $5L + 5P + 8T$  (2.1), comparado con:

2.2) 18L            2.3) 18P            2.4) 18T

3) Composición  $1.5L + 1.5P + 4T$  (3.1), comparada con:

3.2) 7L            3.3) 7P            3.4) 7T

4) Composición triple que mantiene las mismas proporciones de cada agente que en el punto anterior ( $1.5L + 1.5P + 4T$ ), pero con una suma total de anestésico igual a EMLA y AMLI (5 partes de anestésico total). Así mismo, se probaron otras dos combinaciones triples que mantienen la suma total de anestésico igual a EMLA y AMLI (5 partes):

4.1)  $1.07L + 1.07P + 2.86T$ ;

4.2)  $1.5L + 1.5P + 2T$ ;

4.3)  $1.5L + 2P + 1.5T$ , comparadas con:

4.4) 5L    4.5) 5P    4.6) 5T    4.7)  $2.5L + 2.5P$  (EMLA)    4.8)  $2.5L + 2.5T$  (AMLI)

5) Composición  $1.5L + 1.5P + 8T$  (5.1), comparada con:

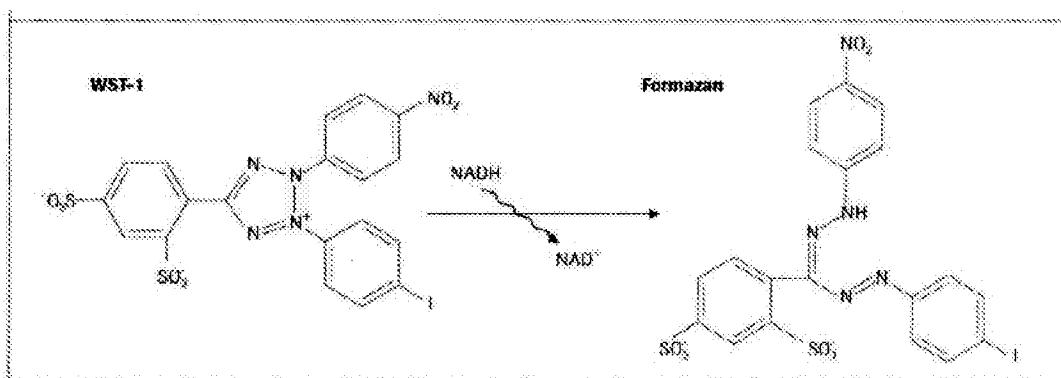
5.2) 11L            5.3) 11P            5.3) 11T

Las concentraciones de cada anestésico están en % (p/p).

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para todo ello, se estudió la toxicidad de estas 24 composiciones de anestésico detalladas anteriormente en células CaCO-2 (epitelial humana, procedentes de un adenocarcinoma colorectal) mediante determinación de viabilidad celular por WST-1. El estudio fue realizado tras 24 horas de tratamiento con las diferentes composiciones de anestésico, y se realizaron cuatro ensayos independientes.

El efecto citotóxico de un compuesto se determina mediante la evaluación del porcentaje de muerte celular que produce dicho compuesto respecto a las células control sin tratamiento. Para ello se cuantifica la viabilidad celular mediante la determinación de la actividad metabólica con el test WST-1 (Roche). Este método está basado en la capacidad de las células de obtener la energía necesaria para mantener sus funciones metabólicas y producir el crecimiento celular. Por este motivo, las células que están metabólicamente activas (vivas) reducen las sales de tetrazolium a formazán mediante el sistema succinato-tetrazolium reductasa (de la cadena respiratoria mitocondrial) y el formazán formado puede ser detectado colorimétricamente (ver Figura 1). Por el contrario, en las células dañadas o muertas no se produce esta reacción.



**Figura1.-** Reacción química producida por el sistema succinato-deshidrogenasa de la cadena mitocondrial celular. Generación de formazán a partir de WST-1

En primer lugar se realizó un ensayo preliminar para determinar la concentración de trabajo óptima que permitiera generar diferencias en la citotoxicidad entre las diferentes

<b>NEURON</b>	Evaluación de la toxicidad de 24 composiciones anestésicas en la línea celular CaCO-2 (de tejido epitelial humano)	
ID CLIENTE: CL139	ID OFERTA: 2010/020	Fecha: 05/11/10

composiciones de anestésico, así como para verificar que el excipiente utilizado no producía toxicidad por sí mismo.

Se realizó una primera prueba diluyendo las muestras 1:10 en el medio de cultivo, lo que causó la muerte de todas las células a las pocas horas del tratamiento. En segundo lugar se realizó la prueba diluyendo las composiciones anestésicas 1:1000 en el medio de cultivo, lo que arrojó los resultados apropiados para poder realizar las comparaciones entre las composiciones de anestésico.

Debido a la viscosidad de las composiciones de anestésico, se realizaron varios ensayos para determinar el procedimiento que produjera la mayor reproducibilidad en los resultados. Finalmente, se optó por preparar una dilución 1:10 en medio de cultivo celular 24 horas antes de la realización de los experimentos, con el objetivo de homogenizar la dilución. En el momento del ensayo, y tras atemperar la preparación, se realizó la segunda dilución a 1:100 en medio de cultivo completo.

<b>NEURON</b>	<b>Evaluación de la toxicidad de 24 composiciones anestésicas en la línea celular CaCO-2 (de tejido epitelial humano)</b>				
ID CLIENTE: CL139		ID OFERTA: 2010/020		Fecha: 05/11/10	

### 3. RESULTADOS

Se ensayaron las 24 muestras composiciones anestésicas sobre las células CaCO-2 a una dilución final optimizada de 1:1000 sobre el medio celular de las células control (sin tratamiento) y de las células tratadas con las composiciones anestésicas.

COMPOSICIÓN	MUESTRAS	MEDIAS	SD	SEM	P-VALUE
EXCIPIENTE		6	9	3	
0,5% L+0,5% P+0,5% T	<b>1.1</b>	2	8	2	REF.
1,5 % L	<b>1.2</b>	3	5	2	4,4E-01
1,5 % P	<b>1.3</b>	5	7	2	1,9E-01
1,5 % T	<b>1.4</b>	6	10	3	1,7E-01
5% L+ 5% P+ 8% T	<b>2.1</b>	23	16	5	REF.
18 % L	<b>2.2</b>	25	16	5	3,8E-01
18 % P	<b>2.3</b>	20	20	6	3,7E-01
18 % T	<b>2.4</b>	64	16	5	1,0E-06
1,5% L+1,5% P+4% T	<b>3.1</b>	42	17	5	REF.
7 % L	<b>3.2</b>	44	15	4	5,0E-01
7 % P	<b>3.3</b>	44	20	6	4,7E-01
7 % T	<b>3.4</b>	56	18	5	5,1E-02
1,07 % L+ 1,07 % P+ 2,86 % T	<b>4.1</b>	5	10	3	REF.
1,5 % L+ 1,5 % P+ 2 % T	<b>4.2</b>	8	8	2	2,5E-01
1,5 % L+ 2 % P+ 1,5 % T	<b>4.3</b>	10	11	3	1,6E-01
5 % L	<b>4.4</b>	21	11	3	8,7E-04
5 % P	<b>4.5</b>	12	7	2	3,3E-02
5 % T	<b>4.6</b>	17	9	3	3,5E-03
2,5 % L + 2,5 % P	<b>4.7</b>	17	7	2	2,6E-03
2,5 % L + 2,5 % T	<b>4.8</b>	23	7	2	4,6E-05
1,5% L + 1,5% P + 8% T	<b>5.1</b>	22	13	4	REF.
11 % L	<b>5.2</b>	22	10	3	4,5E-01
11 % P	<b>5.3</b>	16	12	3	1,2E-01
11 % T	<b>5.4</b>	50	17	5	2,5E-04

**Tabla1.** Se muestran las medias del porcentaje de toxicidad que produce cada una de las composiciones de anestésico sobre las células CaCO-2 tras 24h de tratamiento respecto a las células control (sin tratamiento). Se representan las medias de cuatro ensayos independientes por triplicado. Se muestra la desviación estándar (SD) y el error estándar de la media (SEM). Además se muestra el p-value para el t-test de Student en cada grupo de muestras comparadas con la referencia (REF) en cada caso. Las diferencias con significativas para p<0.05 (5.0E-02)

#### 4. DISCUSIÓN:

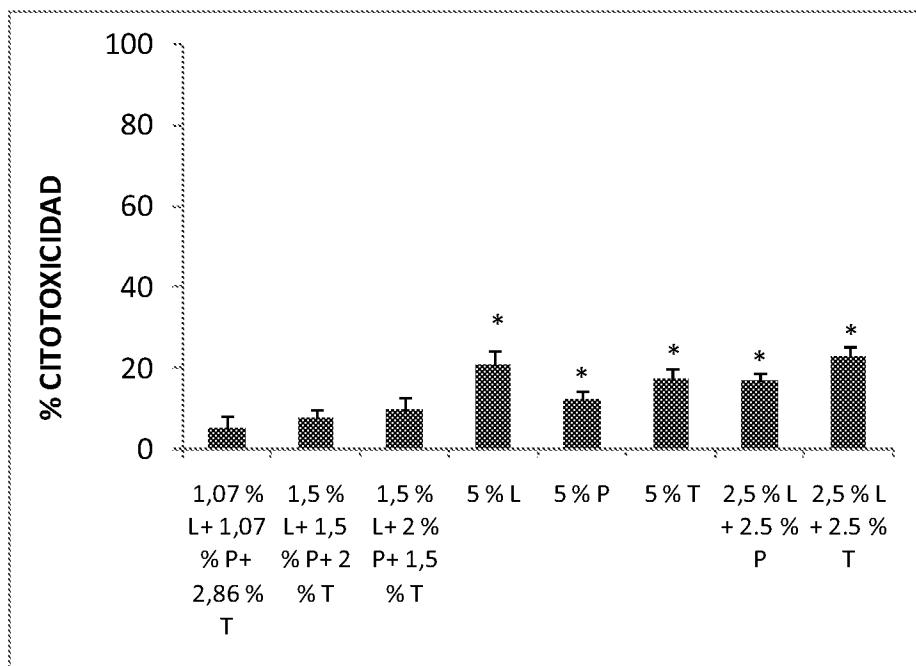
Se realizó el estudio de toxicidad de las 24 composiciones de anestésico proporcionadas en la línea celular CaCO-2. Los resultados indicaron, en primer lugar, que el excipiente (a la dilución utilizada) no muestra toxicidad, por lo que los resultados obtenidos se deben en su totalidad al efecto de los diferentes anestésicos.

El resultado más destacable de los ensayos realizados es la mayor toxicidad que muestra el anestésico T, mientras que los anestésicos L y P presentan una menor toxicidad, siendo similar entre ellos.

En todos los casos la combinación de los tres anestésicos (L,P,T) presenta una menor toxicidad que cada uno de ellos por separado, y esto es especialmente notable cuando se compara la combinación triple con el anestésico T.

Los resultados más interesantes se encontraron en el ensayo 4, en el que la proporción de anestésico se mantiene a 5 (EMLA y AMLI).

La representación gráfica de estos resultados quedó de la siguiente manera:



<b>NEURON</b>	<b>Evaluación de la toxicidad de 24 composiciones anestésicas en la línea celular CaCO-2 (de tejido epitelial humano)</b>	
ID CLIENTE: CL139	ID OFERTA: 2010/020	Fecha: 05/11/10

Como se aprecia en la figura, en todos los casos ensayados, la combinación triple de anestésico presenta menor toxicidad que el resto de las muestras.

Estos datos son significativos y podemos concluir, que una mezcla de tres anestésicos (L, P, T) presenta menos toxicidad en células epiteliales que los anestésicos EMLA y AMLI, a la misma concentración total de anestésico (5 partes).

<b>NEURON BPh</b>	
<b>Elaborado por:</b>	<b>Revisado y aprobado por:</b>
<b>Nombre:</b> María del Carmen Ramos <b>Cargo:</b> Investigadora <b>Unidad:</b> Drug Discovery <b>Fecha:</b> 05/11/10  <i>Firma</i>	<b>Nombre:</b> Javier S. Burgos <b>Cargo:</b> Director Unidad <b>Unidad:</b> Drug Discovery <b>Fecha:</b> 09/11/10  <i>Firma</i>

<b>CLIENTE:</b>	
<b>Recibido por:</b>	
<b>Nombre:</b>	
<b>Organismo:</b>	
<b>Fecha:</b>	<i>Firma</i>

**Fin del documento**